

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
6 décembre 2001 (06.12.2001)

PCT

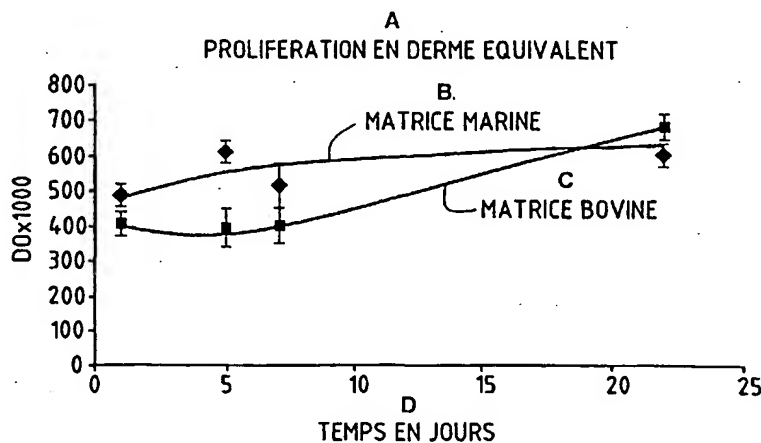
(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/92322 A1

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C07K 14/46, C12N 5/00
- (21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/01629
- (22) Date de dépôt international : 25 mai 2001 (25.05.2001)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :  
00/06748 26 mai 2000 (26.05.2000) FR  
09/616,282 14 juillet 2000 (14.07.2000) US
- (63) Apparenté(e) par continuation (CON) ou par continuation partielle (CIP) à une demande antérieure :  
US 09/616,282 (CIP)  
Déposée le 14 juillet 2000 (14.07.2000)
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : COLET-ICA [FR/FR]; 32 Rue Saint Jean de Dieu, F-69007 Lyon (FR).
- (72) Inventeurs; et  
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : ANDRE, Valérie [FR/FR]; 15 Rue de Montlys Verenay, F-69420 Ampuis (FR). ABDUL MALAK, Nabil [FR/FR]; 27 Rue Frédéric Mistral, F-69300 Caluire (FR). HUC, Alain [FR/FR]; 26 Chemin des Santons, F-69110 Sainte Foy les Lyon (FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: USE OF COLLAGEN OF AQUATIC ORIGIN FOR PRODUCING SUPPORT DESIGNED FOR TISSUE ENGINEERING, AND RESULTING SUPPORTS AND BIOMATERIALS

(54) Titre: UTILISATION DE COLLAGÈNE D'ORIGINE AQUATIQUE POUR LA RÉALISATION DE SUPPORTS DESTINÉS À L'INGÉNÉRIE TISSULAIRE, ET SUPPORTS ET BIOMATÉRIAUX OBTENUS



A...PROLIFÉRATION IN EQUIVALENT DERMIS  
B...MARINE MATRIX  
C...BOVINE MATRIX  
D...TIME (DAYS)

(57) Abstract: The invention concerns the use of collagen of aquatic origin for producing supports designed for tissue engineering. The collagen is advantageously obtained from fish skin, preferably in native form. The invention enables the production of novel tissue engineering supports with low risk of contamination.

[Suite sur la page suivante]

WO 01/92322 A1

---

**WO 01/92322 A1**

(74) Mandataires : PORTAL, Gérard etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 cedex 07 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : DE, JP, KR, US.

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

---

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation de collagène d'origine aquatique pour la réalisation de supports destinés à l'ingénierie tissulaire. Le collagène étant avantageusement obtenu à partir de la peau de poisson, de préférence sous sa forme native. L'invention conduit à la production de nouveaux supports d'ingénierie tissulaire à faible risque de contamination.

WO 01/92322

1

PCT/FR01/01629

**Utilisation de collagène d'origine aquatique pour la réalisation de supports destinés à l'ingénierie tissulaire, et supports et biomatériaux obtenus.**

L'invention concerne essentiellement l'utilisation de collagène d'origine aquatique pour la réalisation de supports destinés à l'ingénierie tissulaire, ainsi que de tels supports et des biomatériaux.

Le collagène constitue un substrat particulièrement favorable pour le développement cellulaire. C'est pourquoi, cette protéine est très utilisée sous plusieurs formes : matrices, gels, ou films pour réaliser des tissus reconstruits comportant des cellules vivantes.

Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, technique promise à un grand avenir, le collagène a conduit en particulier à la réalisation de peaux ou de cartilages artificiels. Pour parvenir à un résultat satisfaisant, le collagène doit être protégé de la dégradation enzymatique provenant du métabolisme cellulaire soit par des procédés de réticulation physiques ou chimiques soit par la présence de macromolécules naturelles ayant de fortes interactions avec la protéine soit enfin par une combinaison des deux systèmes.

Jusqu'à maintenant, pour ces applications d'ingénierie tissulaire, le collagène utilisé dans les supports destinés à recevoir les cellules était extrait de mammifères et le plus souvent de la peau de bovin. Le choix de cette source était dû aux bonnes propriétés mécaniques de la protéine obtenue après extraction, à sa résistance à la dégradation enzymatique et enfin à sa composition en acides aminés très proche de celle du collagène humain. Pour toutes ces raisons, il était légitime de penser que ce collagène était le seul qui pouvait convenir à la culture de cellules humaines.

L'article de Yeh et al dans Faseb Journal, Vol. 14, N°4, du 15 mars 2000 intitulé "a novel native matrix for tissue engineering. Analysis of cell-matrix interaction." Invoque l'emploi de matrice de collagène acellulaire de requin baleine pour l'étude de son interaction avec des kératinocytes et des fibroblastes de peau humaine afin d'étudier la bio-compatibilité.

L'abrégié Derwent XP 002161598 fait référence à une demande de brevet japonais JP 07/075566 de Marino Forum publié le 20 mars 1995 relative à une méthode utilisant du collagène dérivé de poisson comme base de culture. Cependant, cette culture concerne des cellules de poisson.

Le document EP-0 753 313 A1 décrit un substitut de peau utilisant des organismes marins à base d'un laminé comprenant une couche ou feuille de chitine extrait de mollusque ou de calamar. Ici, l'emploi de chitine est critique car lorsque

BEST AVAILABLE COPY

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

2

la solution de chitine a été lyophilisée, on obtient une structure de chitine qui constitue une éponge insoluble non bio-dégradable, la chitine n'étant pas dégradée par les enzymes présentes dans la peau humaine. Un gel de collagène de peau de poisson peut être versé sur la couche ou feuille de chitine, que l'on laisse sécher au réfrigérateur pendant environ une semaine. De ce fait, la couche de collagène est dense et n'est pas poreuse. Elle ne peut donc pas êtreensemencée de cellules vivantes. Le laminé décrit dans ce document est un laminé inerte et il n'est pas prévu qu'il puisse êtreensemencé de cellules vivantes et garder le caractère vivant de ces cellules contrairement à la présente invention décrite ci-après.

Or les inventeurs se sont aperçus de façon inattendue que les cellules humaines se développaient très bien sur ou à l'intérieur de certains supports constitués de collagène de poisson, de préférence réticulé. Ce collagène marin est de préférence issu de la peau de poisson de la famille des téléostéens, plus particulièrement des poissons présentant des zones de peau dépigmentées, encore plus particulièrement des poissons plats, en particulier ceux qui sont pêchés de façon industrielle comme par exemple la sole, la limande, le turbot, le barbeau et dont la préparation des filets implique un dépeçage. Le poisson plat davantage préféré est la sole dont il est aisé de découper la partie ventrale de peau non pigmentée.

De plus, les inventeurs ont pu mettre en évidence que les cellules humaines cultivées dans ces biomatériaux conservaient un métabolisme normal. La bio-compatibilité qui permet une conservation et une capacité de prolifération des cellules humaines vivantes avec du collagène extrait de la peau de poisson de la famille des téléostéens était particulièrement non évidente pour un homme de l'art et cela encore plus, lorsque le collagène est réticulé et notamment réticulé chimiquement, car en général la réticulation du collagène rend ou risque de rendre le collagène réticulé non bio-compatible, toxique vis à vis de cellules vivantes et en particulier de cellules humaines vivantes.

Ces biomatériaux préparés selon l'invention à partir de collagène de poisson peuvent être soit des films, soit des éponges comprimées, soit des matrices poreuses qui seront décrits ainsi que leurs modes de préparation dans les exemples donnés ci-dessous.

La présente invention a pour but de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture de nouveaux supports destinés à l'ingénierie tissulaire apte à former de nouveaux biomatériaux, c'est-à-dire apte à permettre une bonne prolifération des cellules vivantes, normales ou modifiées

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

6

technique quelconque, cette caractéristique étant prise dans sa fonction et dans sa généralité indépendamment du contexte de l'exemple.

Selon un troisième aspect, la présente invention couvre aussi un biomatériau, par exemple sous la forme d'un tissu conjonctif reconstitué, ou de  
5 peau reconstituée, caractérisé en ce qu'il a été préparé à partir du collagène d'origine aquatique tel que précédemment défini dans tous ces aspects et tel qu'il résulte aussi de la description suivante comme pour le support du deuxième aspect ci-dessus.

Dans le cadre de la présente description et des revendications,  
10 l'expression "supports destinés à l'ingénierie tissulaire" signifie un support qui sera utilisé pour réaliser la culture et la prolifération de cellules vivantes, normales ou modifiées génétiquement, ou malignes, que ce soit in vitro ou in vivo, cette prolifération étant de préférence appliquée in vivo sur un mammifère, comprenant  
15 un animal, mieux et de préférence un être humain. On comprend que l'invention trouve une utilisation particulièrement préférée dans le cadre de l'ingénierie tissulaire pour la fabrication de biomatériaux, par exemple sous la forme de tissus conjonctifs reconstitués ou de peaux reconstituées. Dans ce cadre, une première  
20 étape sera généralement une culture du support avec lesdites cellules vivantes in vitro pour aboutir à un biomatériau, par exemple sous la forme d'un tissu conjonctif reconstitué ou de peau reconstituée, puis, dans une deuxième étape, l'utilisation de ce biomatériau en tant que tissu conjonctif reconstitué ou de peau reconstituée in vivo sur un mammifère, par exemple animal et de préférence et  
25 mieux un être humain, afin de reconstituer un tissu conjonctif endommagé ou supprimé par chirurgie, ou de même pour une peau reconstituée remplaçant une zone de peau endommagée ou éliminée par voie chirurgicale pour une raison médicale quelconque.

Avantageusement, le support destiné à l'ingénierie tissulaire, ou mieux le biomatériau, qui se présente par exemple sous la forme d'un tissu conjonctif reconstitué, ou de peaux reconstituées, comprend des cellules soit obtenues  
30 sensiblement exclusivement à partir de sujets jeunes, soit obtenues sensiblement exclusivement à partir de sujets âgés, en particulier pour étudier le processus du vieillissement tissulaire et en particulier cutané et éventuellement tester l'efficacité d'ingrédients ou principes actifs sur ce processus.

On comprend ainsi que l'invention permet de résoudre dans l'ensemble  
35 de nouveaux problèmes techniques énoncés précédemment d'une manière particulièrement simple, à faible coût, à faible risque de contamination et avec une

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

7

capacité de différenciation du collagène aquatique relativement au collagène du mammifère, et de préférence du collagène d'un être humain, nouvellement synthétisé lors de l'utilisation in vivo.

En effet, la mise en œuvre de collagène de poisson dans la réalisation  
5 de tissus artificiels vivants apporte trois avantages essentiels par rapport à la source mammifère :

10 . La peau de poisson matière première généralement utilisée, peut être obtenue en abondance dans des conditions de grande propreté.

. Le danger de contamination infectieuse est très faible. En particulier le risque de transmission d'agents de type prion est inconnu à ce jour.

15 . Enfin, le collagène de poisson ayant une composition en acides aminés relativement éloignée de celle du collagène humain les deux protéines peuvent être différenciées de façon relativement aisée grâce à des anticorps spécifiques. Cette méthodologie sera très précieuse en particulier dans les tests « in vitro » ou dans les études de cicatrisation « in vivo ».

20 En outre, l'emploi de collagène marin va rendre l'immunomarquage très efficace et permettre la différenciation du collagène marin relativement au collagène nouvellement synthétisé.

25 Le collagène de poisson a une structure native qui le protège de la dégradation enzymatique due aux protéases et qui lui confère une grande partie de ses propriétés mécaniques. Il sera donc très important lors des opérations de l'extraction et de la purification que les traitements utilisés altèrent le moins possible la structure de la protéine. Cela signifie que la structure hélicoïdale ainsi que les réticulations inter et intramoléculaires soient le plus possible préservées. Pour cela, les inventeurs ont plus particulièrement mis en œuvre le procédé décrit dans le brevet US N° 5331092 délivré le 19 juillet 1994. Néanmoins, pour des  
30 applications particulières, l'emploi de collagène partiellement déréticulé pourra être envisagé, par exemple de l'atélcollagène, c'est-à-dire du collagène ayant perdu une partie de ses télépeptides.

35 Ensuite, pour la plupart des applications d'ingénierie tissulaire les propriétés mécaniques du collagène seront renforcées et sa résistance à la digestion enzymatique augmentée soit par des techniques de réticulation chimiques et/ou physiques, soit par adjonction de macromolécules naturelles ayant

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

8

de fortes interactions avec la protéine soit enfin par une combinaison des deux procédés.

La protection du collagène de poisson sera d'autant plus importante que sa stabilité naturelle est plus faible que celle du collagène de mammifère.

5 Cette dernière caractéristique est due à un taux plus faible d'hydroxyproline.

Les biomatériaux précédemment décrits pourront être ensemencés avec des cellules vivantes et donneront ainsi naissance à des tissus artificiels vivants qui pourront être utilisés soit dans le domaine des tests « in vitro » soit dans le domaine pharmaceutique pour la réparation des tissus lésés.

10 D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à la lumière de la description explicative qui va suivre faite en référence aux exemples de réalisation de forme de collagène d'origine aquatique pouvant être utilisé dans le cadre de l'invention pour la réalisation des supports destinés à l'ingénierie tissulaire, et constituant ainsi de tels supports ainsi que des  
15 biomatériaux, donnés simplement à titre d'illustration et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de l'invention.

Dans les exemples, la température est donnée en degré Celsius, la pression est la pression atmosphérique, et les pourcentages sont donnés en poids sauf indication contraire.

20 Les exemples 1 à 13 constituent bien entendu des exemples de préparation de collagène utilisable comme support d'ingénierie tissulaire selon l'invention.

Les exemples 14 à 16 constituent des essais notamment comparatifs, dans le cadre de l'utilisation de ce collagène d'origine aquatique, sous les formes  
25 préparées dans certains des exemples 1 à 13, dans le cadre de la réalisation de supports destinés à l'ingénierie tissulaire.

Dans les figures annexées :

- la figure 1 représente la prolifération des fibroblastes humains normaux en derme équivalent, avec le temps exprimé en jour et en abscisse et la  
30 densité optique x 1000 en ordonnées avec des unités augmentant de 100 ; la courbe avec les losanges est celle qui est obtenue en utilisant comme support une matrice poreuse de collagène aquatique, ici de poissons, et la courbe avec des carrés est obtenue avec du collagène bovin ; et

- la figure 2 représente une courbe de prolifération similaire de  
35 fibroblastes en derme équivalent avec en abscisse le temps exprimé en jour et en ordonnées la fluorescence exprimée en unité internationale, commençant à 15.000

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

9

avec des unités augmentant de 10.000 ; la courbe avec les losanges pleins représente la fluorescence obtenue dans le cadre de l'essai 1 ; la courbe avec le carré celle obtenue avec l'essai 2 ; la courbe avec les triangles vides étant obtenue avec l'essai 3 et enfin la courbe avec les croix étant celle obtenue avec l'essai 4.

5

### **EXEMPLE 1**

#### **Préparation d'une matrice poreuse en collagène natif aquatique**

Le collagène étant obtenu selon la technique du brevet US 5331092 accordé le 19 juillet 1994

#### **10 A - Obtention du collagène natif aquatique**

Un gel de collagène est préparé à partir de peaux ventrales de sole broyées puis lavées avec un tampon phosphate pH 7.8 dont la composition est : 0.78 g/l de dihydrogénophosphate de potassium et 21.7 g/l de monohydrogénophosphate disodique. Le lavage s'effectue sous agitation pendant une heure à raison de 5 l de tampon pour 1 kg de broyat. Le phosphate est ensuite éliminé par deux lavages successifs à l'eau permutée, puis par une centrifugation en continu à 4000 t/mn (décanteur Rousselet), à raison de 5 l d'eau pour 1 kg de broyat.

15

Le broyat est alors acidifié par une solution d'acide acétique 0.25 M à raison de 1 kg de broyat pour 10 l de solution. Le gel est alors centrifugé à 4000 t/mn pendant 5mn.

20

Le gel qui sera utilisé est constitué par le surnageant obtenu dont la concentration en collagène est comprise entre 0.5 et 2 %.

#### **25 B - Préparation de la matrice poreuse à partir du gel de collagène obtenu précédemment**

Ce gel est coulé dans un plateau de lyophilisation à raison de 20 g/cm<sup>2</sup>. Il est alors lyophilisé après congélation à -30° C et chauffage à + 32° C. La lyophilisation dure au total 16 heures sous une pression de 400 microbars.

30

La matrice obtenue est alors réticulée par déshydratation hydrothermique (DHT). Celle-ci consiste en un chauffage dans une étuve à 110° C sous un vide de 400 microbars pendant 16 heures.



WO 01/92322

PCT/FR01/01629

10

**EXEMPLE 2**

Préparation d'une matrice poreuse réticulée grâce au diphénylphosphorylazide (DPPA) selon la technique décrite dans le brevet européen N° 466 829 du 24 juillet 1996

5

La matrice de collagène de l'exemple 1 est incubée 24 h dans une solution renfermant 5 à 250 µl de DPPA/g de collagène contenu dans 100 ml de diméthylformamide (DMF). Le collagène est ensuite débarrassé du DPPA par rinçage dans 100 ml de DMF. Le DMF est ensuite éliminé par rinçage dans 100 ml d'une solution de tampon borate pH 8.9 (tétraborate de sodium 0.04 M, acide borique 0.04 M).

10

Le collagène est finalement incubé pour une nuit dans le même tampon borate. Enfin le tampon borate est éliminé par rinçage à l'eau permutée en continu pendant 6 h.

15

**EXEMPLE 3**

Préparation d'une matrice poreuse réticulée par le carbodiimide et le N-hydroxysuccinimide

20

La matrice de collagène aquatique de l'exemple 1 est réticulée avec de l'EDC (Ethyl diméthylaminopropyl carbodiimide) à la concentration de 0.23 à 0.69 g/g de collagène, et avec du NHS (N-hydroxysuccinimide) à la concentration de 0.42 g/g de collagène.

Après rinçage à l'eau permutée, le collagène est à nouveau lyophilisé.

25

**EXEMPLE 4**

Préparation d'une matrice poreuse réticulée par le glutaraldéhyde

La matrice poreuse de collagène aquatique de l'exemple 1 est réticulée pendant 24 à 96 h dans une solution contenant 0.6 à 1 % de GTA à 20°C.

Après rinçage avec l'eau permutée, le collagène est à nouveau lyophilisé.

30

**EXEMPLE 5**

Matrice poreuse préparée avec le collagène natif aquatique de l'exemple 1 en association avec du chitosane et un glycosaminoglycane comme décrit dans le brevet européen du 29 mai 1991 N° 296078

35

A 600 g de gel à 1.5 % de collagène, sont ajoutés 2.5 g de chitosane dissous dans 356 ml d'eau et 1.9 ml d'acide acétique, puis une solution renfermant

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

11

1 g de chondroïtine 4 sulfate contenu dans 400 ml d'eau permutée. Le mélange dont le pH est d'environ 4.0 est ensuite agité puis lyophilisé. L'éponge obtenue est réticulée par DHT.

## 5 **EXEMPLE 6**

Matrice poreuse décrite dans l'exemple 1 surfacée avec un film de collagène

### **A - Préparation du film**

10 Le gel de collagène dont la matière sèche est comprise entre 0.3 et 0.8 % est séché dans une étuve à 30° C ou sous hotte à raison de 0.5 g de gel/cm<sup>2</sup> de plateau.

Dans le gel de collagène il est possible d'ajouter de 10 à 40 % de glycérol.

Le collagène séché dans ces conditions forme un film transparent.

15

### **B - Association du film avec la matrice poreuse décrite plus haut**

Le gel de collagène aquatique natif de 0.5% à 2% en matière sèche, est déposé à raison de 0.5g par cm<sup>2</sup> dans un plateau de lyophilisation, puis le

20

film de collagène est déposé sur ce gel et l'ensemble est lyophilisé.

Le lyophilisat obtenu est réticulé par DHT.

## **EXEMPLE 7**

Matrice poreuse préparée avec un gel de collagène acido-soluble surfacée avec un  
25 film de collagène

Le procédé est celui indiqué dans l'exemple 6, la seule différence étant constituée par la nature du gel coulé sur le film qui est constitué de collagène acido-soluble préparé selon une technique bien connue de l'homme de l'art.

30

## **EXEMPLE 8**

Matrice poreuse préparée avec un gel d'atélocollagène ou surfacée avec un film de  
collagène

35

Le procédé est celui indiqué dans l'exemple 6, la seule différence étant constituée par la nature du gel coulé sur le film qui est constitué

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

12

d'atélocollagène c'est-à-dire de collagène sans télopeptide préparé selon une technique bien connue de l'homme de l'art.

#### EXEMPLE 9

- 5 Matrice poreuse constituée de collagène associé avec du chitosane et un glycosaminoglycane surfacée avec un film de collagène.

Le procédé est celui indiqué dans l'exemple 6, mais dans ce cas le gel coulé sur le film du collagène est constitué de collagène, de chitosane, d'un glycosaminoglycane. La préparation de ce gel est décrite dans l'exemple 5.

10

#### EXEMPLE 10

Toutes les matrices poreuses surfacées avec un film de collagène décrites précédemment peuvent être réticulées selon les techniques décrites dans les exemples 2, 3 et 4.

15

#### EXEMPLE 11

Matrice poreuse en collagène seul décrite dans l'exemple 1 surfacée avec une éponge de collagène comprimée.

- 20 A - Préparation de l'éponge comprimée

Le gel de collagène préparé comme dans l'exemple 1 et ayant une matière sèche comprise entre 0.3 et 1.5 % est lyophilisé de façon à obtenir une éponge ayant un poids compris entre 0.5 et 2 g/cm<sup>2</sup>.

- 25 Le lyophilisat est comprimé pendant 5 à 60 secondes, à une température comprise entre 20 et 60° C et une pression située entre 50 et 200 bars (50 à 200.10<sup>5</sup> Pa).

- B - Association de l'éponge comprimée avec la matrice poreuse

30

Le gel de collagène décrit dans l'exemple 1 est déposé à raison de 0.5 g par cm<sup>2</sup> dans un plateau de lyophilisation. L'éponge comprimée est alors déposée sur ce gel et l'ensemble est lyophilisé. Une éponge poreuse de collagène surfacée avec une éponge comprimée de collagène est ainsi obtenue. L'ensemble est réticulé par DHT comme décrit dans l'exemple 1.

35

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

13

**EXEMPLE 12**

Matrice poreuse constituée de collagène, de chitosane et de glycosaminoglycane telle que décrite dans l'exemple 5 et surfacée avec l'éponge comprimée.

- 5 Le gel de collagène, de chitosane et de glycosaminoglycane, préparé selon le procédé de l'exemple 5 est déposé à raison de 0.5 g par cm<sup>2</sup> dans un plateau de lyophilisation, puis l'éponge comprimée est déposée sur ce gel et l'ensemble est lyophilisé. Le lyophilisat est alors réticulé par DHT comme décrit dans l'exemple 1.

10 **EXEMPLE 13**

Toutes les matrices poreuses surfacées avec une éponge de collagène comprimée décrites plus haut peuvent être réticulées selon les techniques décrites dans les exemples 2, 3 et 4.

15 **EXEMPLES 14 A 16 : Essais de comparaison du métabolisme cellulaire entre les matrices collagéniques bovines et aquatiques**

**EXEMPLE 14 : ESSAI DE VIABILITE CELLULAIRE DE FIBROBLASTE**

**I - Préparation des dermes équivalents**

- 20 Pour cet essai de comparaison, on fabrique d'une part une matrice poreuse aquatique réticulée au DPPA, selon l'exemple 2.

A titre de comparaison, on fabrique une matrice poreuse comparative avec du collagène d'origine bovine, dite matrice bovine, également réticulée au DPPA, dans les mêmes conditions que celles de l'exemple 2.

- 25 On prend des fibroblastes humains normaux issus d'un pool de donneurs jeunes utilisé au 7<sup>ème</sup> passage et que l'onensemence dans chacune des matrices aquatique et bovine, à raison de 250 000 cellules par cm<sup>2</sup> dans le cas de l'étude de prolifération et de synthèse protéique, et que l'onensemence à raison de 300 000 cellules par cm<sup>2</sup> pour les matrices aquatique et bovine destinées aux
- 30 études d'histologie.

On effectue la culture de ces matrices respectivement aquatique et bovine dans du milieu composé de DMEM/HAM F 12 dans un rapport 50/50 (v/v) additionné de 10 % de sérum de veau foetal, 100 UI/ml de pénicilline, 25 µg/ml de gentamycine, 1 µg/ml d'amphotéricine B, 50 µg/ml de vitamine C.

- 35 On réalise cette culture pendant 1 mois en changeant le milieu de culture 3 fois par semaine.

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

14

## II - Analyses réalisées

### 1) Mesure de la viabilité cellulaire par réaction au MTT

On ajoute 1 % en poids de MTT (c'est-à-dire le 3-(4-(diméthylthiazol-2-yl)2,5-diphényltétrazolium bromure) dans le milieu de culture.

5 On réalise une incubation pendant 2,5 heures à 37°C.

Après incubation pendant cette durée, la densité optique du produit de transformation (bleu formazan) est lue à 550 nm après solubilisation dans le DMSO.

10 La densité optique obtenue est proportionnelle à l'activité des succinate-déshydrogénases qui sont capables d'effectuer la transformation du sel de tétrazolium MTT jaune clair en cristaux bleus de formazan.

La viabilité cellulaire a été réalisée après 1, 5, 7, 22 jours et un mois de culture.

15 Pour déterminer les valeurs moyennes, on a réalisé 6 échantillons pour chaque matrice.

TABLEAU I  
DE RESULTATS

Jours	Matrice aquatique	Déviati on au standard moyenne	Matrice bovine	Déviati on standard moyenne
1	487	24	403	40
5	604	19	393	59
7	520	56	398	64
22	608	30	680	40

20

Ces résultats font également l'objet des courbes de la figure 1 annexée.

On notera que la courbe avec les losanges est celle obtenue avec la matrice aquatique et la courbe avec les carrés est celle obtenue avec la matrice bovine.

25

On observe à partir des résultats que de manière totalement surprenante, la matrice aquatique non seulement constitue un support permettant la survie de fibroblastes humains normaux mais aussi la prolifération cellulaire de ces fibroblastes humains normaux, tout en constituant même un support de culture bien meilleur pendant les trois premières semaines.

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

15

Il peut donc être conclu de ces essais que le collagène aquatique est, de manière surprenante, particulièrement adapté pour réaliser un support d'ingénierie tissulaire en particulier pour des applications in vitro et même et surtout in vivo pour constituer des biomatériaux contenant des cellules vivantes et en particulier et de préférence des cellules vivantes d'êtres humains.

## 2) Mesure des synthèses protéiques

La synthèse des protéines sécrétées pendant 3 jours dans un milieu de culture sans sérum de veau foetal a été évaluée après un mois de maturation des dermes équivalents, tels qu'obtenus après le mois de culture dans les conditions rapportées ci-dessus dans la préparation des dermes équivalents.

Le dosage est réalisé par la méthode du microBCA de Pierce.

Parallèlement, la densité cellulaire a été évaluée par un test au MTT dans les conditions décrites ci-dessus.

La teneur en protéines relative correspond à la teneur protéique ramenée à 1 unité de densité cellulaire exprimée en densité optique ou DO, afin de raisonner à concentration cellulaire équivalente. Les résultats obtenus sont répertoriés au tableau II ci-après :

20

TABLEAU II  
RESULTATS DE SYNTHESE PROTEIQUE

Collagène du support	Matrice aquatique		Matrice bovine	
	Moyenne	*	Moyenne	*
Densité cellulaire (DO)	2,12	0,09	1,91	0,13
Protéines (µg/ml)	494	48	499	32
Teneur en protéines relative	233	18	262	23

\* : Déviation standard moyenne

25

Comme pour le tableau I, la moyenne résulte d'une moyenne réalisée sur 6 échantillons.

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

16

### 3) Histologie

Les dermes équivalents obtenus après culture pendant 21 jours de culture à partir des matrices en collagène aquatique et bovin sont fixés dans une solution à 2 % en paraformaldéhyde puis post-fixés dans une solution de tétroxyde d'osmium, déshydratés, inclus en Epon, coupés et observés en microscopie électronique à transmission (Jeol 1200) au CMEABG (Lyon, France).

### Conclusions

Ces résultats indiquent une très bonne colonisation des matrices tridimensionnelles qu'elles soient aquatiques ou bovines. Après trois semaines de culture, la densité cellulaire est équivalente dans les deux types de matrices. Toutefois, il semble que la matrice aquatique permette une meilleure adhésion cellulaire en début d'expérimentation comme l'indique l'étude de prolifération lors de la première semaine de culture et ainsi une meilleure colonisation pour des temps courts de culture.

En ce qui concerne les synthèses protéiques, après un mois de culture les capacités de synthèse des fibroblastes (teneur en protéines relative) sont également équivalentes.

Ces résultats indiquent que les matrices de collagène aquatique mises au point ont permis la préparation de dermes équivalents de bonne qualité ; les résultats obtenus avec ces matrices étant comparables à ceux obtenus avec des matrices de collagène bovin.

En microscopie électronique à transmission, les fibroblastes ont pu être observés dans les matrices d'origine bovine et aquatique. Dans les deux types de matrices, on note la présence d'une abondante matrice extracellulaire néosynthétisée. On peut différencier la matrice extracellulaire néosynthétisée grâce à la striation périodique des fibres de collagène déposé comparativement aux amas collagéniques formant la matrice tridimensionnelle de l'éponge de départ.

30

### EXEMPLE 15

#### Influence des différents types de réticulation des matrices collagéniques aquatiques sur la viabilité cellulaire

Pour étudier l'influence des différents types de réticulation des matrices collagéniques aquatiques sur la viabilité cellulaire, on procède aux essais suivants :

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

17

# I) Préparation des dermes équivalents

## a) Support ou matrice utilisé

On prépare divers supports ou matrices de collagène en utilisant diverses proportions de collagène dans le gel de collagène servant à fabriquer la  
5 couche ou matrice poreuse et en utilisant éventuellement un agent de réticulation différent, comme suit :

### 1) Essai 1

Pour cet essai, on fabrique une matrice poreuse sous forme d'éponge poreuse à partir d'un gel de collagène aquatique préparé à partir de 1,3 % en poids  
10 en collagène aquatique, que l'on congèle à -80°C et que l'on soumet à une lyophilisation standard conforme à l'exemple 2 et que l'on soumet ensuite à une réticulation au DPPA à une proportion de 250 µl/g d'éponge à l'état sec.

### 2) Essai 2

Pour cet essai, on prépare un support poreux sous forme d'éponge aquatique à partir d'un gel de collagène aquatique comprenant 0,7 % en poids de  
15 collagène aquatique, que l'on soumet à une congélation à -80°C, puis à une lyophilisation standard et une réticulation au DPPA à 250 µl/g sec comme dans l'essai 1.

20

### 3) Essai 3

Pour cet essai, on procède comme pour l'essai 1, si ce n'est que la réticulation a lieu avec l'EDC, selon l'exemple 3, à une proportion de 0,46 g/g  
d'éponge sèche.

25

### 4) Essai 4

On prépare un support poreux comprenant une éponge de collagène aquatique obtenu à partir d'un gel de collagène aquatique comprenant 1,1 % en  
poids de collagène aquatique, que l'on soumet à une congélation à -80°C, puis à  
30 une lyophilisation standard et à une réticulation au DPPA à 250 µl/g sec comme dans l'essai 2, la différence résidant dans une proportion de 1,1 % en poids de collagène aquatique.

Dans l'ensemble de ces essais, le collagène aquatique est issu, comme dans l'exemple 2, de la peau ventrale de sole.



WO 01/92322

PCT/FR01/01629

18

b) Culture des fibroblastes sur ces matrices

On utilise, comme dans l'exemple 14, des fibroblastes humains normaux mais qui sont prélevés au 8<sup>ème</sup> passage.

On réalise un ensemencement à raison de 275 000 cellules par cm<sup>2</sup>.

- 5 Le milieu culture est composé de DMEM/HAM F12 50/50 (v/v) additionné de 10 % en poids de sérum de veau foetal, 100 UI/ml de pénicilline, 25 µg/ml de gentamycine, 1 µg/ml d'amphotéricine B, 50 µg/ml de vitamine C.

On réalise la culture pendant 1 mois en changeant de milieu 3 fois par semaine.

- 10 Pour chaque essai, on utilise 4 matrices afin d'effectuer une moyenne pour chaque type d'essai et mesurer la déviation standard moyenne.

II) Analyses réalisées

Mesure de la viabilité cellulaire par réaction à l'Alamar Blue (marqueur d'oxydoréduction)

- 15 L'Alamar Blue est ajouté à raison de 2 % en poids d'un milieu de culture utilisé, au moment où l'on souhaite mesurer la viabilité cellulaire sur un prélèvement réalisé sur le milieu culture.

- 20 Après incubation à 2 h 20 à 37°C, on lit la fluorescence, sur la base d'une excitation à 530 nm et une émission à 590 nm).

L'intensité de la fluorescence obtenue est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules.

On effectue la mesure de la viabilité cellulaire sur 10 échantillons après 1, 4 6, 11 17 jours de culture.

- 25 Les résultats sont exprimés au tableau III ci-après.

Les résultats sont indiqués en unité internationale de fluorescence en fonction du temps.

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

19

**TABLEAU III**  
**VIABILITE CELLULAIRE (u I fluorescence)**

Temps (jours)	ESSAI 1		ESSAI 2		ESSAI 3		ESSAI 4	
	Moyenne	SD*	Moyenne	SD*	Moyenne	SD*	Moyenne	SD*
1	21734	1184	30535	1888	25528	6820	28461	3805
4	31611	920	35623	3544	36404	3570	45126	2930
6	43144	2500	35244	2095	37819	4170	41254	3396
11	42808	1481	38532	2537	42442	3112	44508	2329
17	45484	2426	45094	1470	43963	8285	43939	4521
Ordre	1		2		3		4	

5   \* : Déviation standard

Les résultats du tableau 3 font aussi l'objet de la figure 2 annexée.

Ils montrent les courbes de prolifération fibroblastique en derme équivalent.

10       La courbe en losange plein est celle réalisée avec l'essai 1 ; la courbe en carré plein est celle réalisée avec l'essai 2 ; la courbe en triangle est celle réalisée avec l'essai 3 et la courbe avec les croix est celle réalisée avec l'essai 4.

Le temps est exprimé en jour en abscisse et la fluorescence en UI avec une échelle démarrant à 15 000 et augmentant par unité de 10 000 jusqu'à 55 000.

15       Les résultats permettent d'aboutir aux conclusions suivants.

### Conclusions

20       Les résultats indiquent les différentes matrices préparées peuvent permettre une bonne croissance fibroblastique après 17 jours de culture. Quelle que soit la préparation des matrices collagéniques aquatiques, les fibroblastes adhèrent bien à leur support tridimensionnel et se divisent très rapidement afin de coloniser la matrice.

25       Le profil de prolifération est très légèrement variable d'un type de matrice à l'autre mais après 17 jours de culture, la densité fibroblastique est comparable quel que soit le procédé de fabrication.

Les différents types de réticulation employés réalisés soit avec le DPPA ou avec l'EDC ne semblent pas influencer le renouvellement cellulaire.

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

20

Après pratiquement 3 semaines de culture, la stabilité des matrices est excellente, à savoir peu de digestion, peu de contraction.

#### **EXEMPLE 16 :**

##### **5 Essai démontrant les avantages du collagène aquatique pour la mise en évidence et le dosage du collagène humain néosynthétisé**

Cet essai est similaire à celui de l'exemple 14, si ce n'est que l'on effectue une histologie avec immuno-marquage.

L'essai a lieu de la manière suivante :

10

##### **1) Préparation des dermes équivalents**

Il s'agit de dermes équivalents de l'exemple 14, la culture étant réalisée dans les conditions de l'exemple 14.

15 Cette culture est donc effectuée pendant trois semaines en changeant le milieu trois fois par semaine, l'ensemencement des fibroblastes humains normaux ayant eu lieu à 300.000 cellules par cm<sup>2</sup> comme cela était indiqué dans l'exemple 14.

##### **2) Histologie**

##### **20 a) Histologie classique**

On réalise la fixation avec le paraformaldéhyde à une teneur de 4 % en poids , on réalise ensuite une déshydratation et une inclusion en paraffine.

On effectue ensuite des coupes à 7 µm et une coloration Mallory Haidenhain après déparaffinage et réhydratation.

25

##### **b) Immunomarquage**

On fixe également avec le paraformaldéhyde à 4 % en poids, on réalise une inclusion en Tissue Tek OCT compound, c'est-à-dire un liquide d'inclusion fourni par Miles, Elkhart, Indiana, USA, et une coupe à froid à 7 µm.

30

L'immunomarquage est effectué de la manière suivante :

i. Avec un premier anticorps anti-collagène de type I humain de lapin (dilution 1/40)

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

21

ii. Un deuxième anticorps anti-lapin conjugué FITC (Fluorescéine Iso ThioCyanate) (dilution 1/160)

Contre coloration avec DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, dilactate).

5

### 3) Résultats

On constate que les support constitués respectivement par une matrice aquatique et une matrice bovine forment des pores plus ou moins lâches dans lesquels viennent adhérer les fibroblastes.

10

En surface, on note une proportion plus importante de fibroblastes formant un surfaçage favorable du derme équivalent pour la réalisation d'une peau reconstruite. La répartition des fibroblastes est homogène dans les éponges aquatique et bovine.

15

En immunomarquage, on constate que la matrice formée de collagène bovin est marquée par l'anticorps anti-collagène de type I humain (croisement).

Par contre, la matrice d'origine aquatique n'est que très faiblement marquée par l'anticorps anti-collagène humain.

L'utilisation des éponges composées de collagène aquatique est donc favorable à la mise en évidence de la matrice extracellulaire néosynthétisée.

20

Ces résultats s'expliquent par les travaux du Professeur Hartmann sur les réactions des différents antigènes par rapport aux différents anticorps déterminés par les mesures des densités optiques après immunomarquage données au tableau IV dit de Hartmann ci-après :

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

22

TABLEAU IV  
Réaction croisée humain, bovin, poisson (test Elisa)

Antigènes Anticorps	Collagène I sole	Collagène I humain	Collagène I bovin
20111 (225)			
1/25	190	>	815
1/50	210	>	548
1/100	73	1233	234
1/200	43	605	136
1/400	56	326	165
50121 (03)			
1/25	180	1550	>
1/50	130	1094	>
1/100	158	536	>
1/200	96	305	967
1/400	109	215	728
50171 (01)			
1/25	1880	64	73
1/50	1043	193	32
1/100	571	51	33
1/200	523	51	87

(&gt; : densité optique supérieure à 2000)

5

Les résultats sont exprimés en D.O. x 10<sup>3</sup> (densité optique à  
 $\lambda = 450 \text{ nm}$ )

Légendes : 20111 (225) : anti-collagène I humain

50121 (03) : anti-collagène I bovin

10

50171 (01) : anti-collagène I poisson (sole)

De ce tableau de résultats, il ressort que quel que soit l'anticorps (anti-collagène type I humain, anti-collagène type I bovin, anti-collagène type I de sole), en immunomarquage, la différence est beaucoup plus importante entre le  
 15 collagène humain et le collagène de sole qu'entre le collagène humain et le

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

23

collagène bovin. Il en résulte que dans une matrice de collagène de poisson, le collagène synthétisé par les fibroblastes humains pourra être mis en évidence beaucoup plus aisément. Ceci confirme les résultats décrits précédemment obtenus par un immunomarquage par l'anticorps anti-collagène de type I humain du

5 collagène synthétisé dans la matrice de collagène de poisson, ce qui constitue un résultat particulièrement inattendu et avantageux de l'invention.

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

24

### REVENDEICATIONS

1. Utilisation de collagène d'origine aquatique, de préférence issu de la peau de poisson de la famille des téléostéens, pour la réalisation de supports destinés à l'ingénierie tissulaire.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le collagène est obtenu à partir de la peau de poisson de la famille des téléostéens, plus particulièrement des poissons présentant des zones de peau dépigmentée, encore plus particulièrement des poissons plats, en particulier ceux qui sont pêchés de façon industrielle comme par exemple la sole, la limande, le turbot, le barbeau, de préférence la sole.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le collagène a sa résistance mécanique renforcée ou sa résistance à la digestion enzymatique augmentée soit par une réticulation chimique et/ou physique, soit par adjonction d'une macromolécule naturelle ayant de fortes interactions avec le collagène, soit par une combinaison des deux procédés.

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le collagène est utilisé sous forme d'une matrice poreuse préparée à partir d'un gel de collagène soumis de préférence à une étape de lyophilisation.

5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que la matrice poreuse précitée est réticulée par une réticulation physique, de préférence par déshydratation hydrothermique ou DHT.

6. Utilisation selon la revendication 4 ou 5, caractérisée en ce que la matrice poreuse précitée est réticulée par une réticulation chimique, de préférence au diphénylphosphorylazide ou DPPA ou par un carbodiimide ou le N-hydroxysuccinimide ou par le glutaraldéhyde.

7. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le collagène précité se présente sous forme d'une matrice poreuse préparée à partir de collagène aquatique de préférence natif, mélangé avec du chitosane et éventuellement au moins un glycosaminoglycane de préférence le chondroïtine sulfate.

8. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le collagène précité se présente sous forme d'une matrice poreuse préparée à partir d'un gel de collagène, ladite matrice poreuse étant revêtue sur au moins une face d'une membrane essentiellement compacte collagénique réalisée soit par un film collagénique préparé par séchage, de préférence à l'air ou dans un

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

25

fluide gazeux, d'un gel de collagène, soit par une éponge collagénique très fortement comprimée.

9. Utilisation selon la revendication 6, 7 ou 8, caractérisée en ce qu'au moins une des deux couches, respectivement la couche poreuse et la membrane  
5 essentiellement compacte, comprend des cellules vivantes, normales ou modifiées génétiquement, ou malignes, en particulier provenant de sujets jeunes ou de sujets âgés.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que les cellules vivantes sont choisies parmi le groupe consistant de fibroblastes,  
10 kératinocytes, mélanocytes, cellules de langerhans d'origine sanguine, cellules endothéliales d'origine sanguine, cellules sanguines, en particulier macrophages ou lymphocytes, cellules de langerhans d'origine sanguine, cellules endotéliales d'origine sanguine, cellules sanguines, adipocytes, sébocytes, des chondrocytes, des cellules osseuses, des ostéoblastes, cellules de Merkel d'origine sanguine,  
15 normales ou génétiquement modifiées ou malignes.

11. Utilisation selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce que la couche poreuse contient des fibroblastes normaux, génétiquement modifiés ou malins, et la membrane sensiblement compacte contient des cellules vivantes normales ou génétiquement modifiées ou malignes, en particulier choisies parmi  
20 des kératinocytes, des mélanocytes, des cellules de Merkel d'origine sanguine, des cellules de langerhans d'origine sanguine, des sébocytes, des cellules d'origine sanguine, des cellules nerveuses.

12. Utilisation selon l'une des revendications 8 à 11, caractérisée en ce que la compression précitée de l'éponge collagénique très fortement comprimée  
25 est réalisée à une pression minimum égale à environ 50 bars ( $50 \cdot 10^5$  Pa), de préférence comprise entre 50 bars ( $50 \cdot 10^5$  Pa) et 200 bars ( $200 \cdot 10^5$  Pa), cette compression ayant éventuellement été réalisée à une température comprise entre 20°C et 80°C, encore mieux entre 40°C et 60°C.

13. Utilisation selon l'une des revendications 8 à 12, caractérisée en ce  
30 que la membrane sensiblement compacte est préparée préalablement à la combinaison avec la couche poreuse, de préférence comprenant une éponge collagénique, en particulier en préparant la membrane et en la déposant sur un gel collagénique avant que l'ensemble ne soit congelé et lyophilisé.

14. Support destiné à l'ingénierie tissulaire, caractérisé en ce qu'il  
35 comprend du collagène tel que défini à l'une quelconque des revendications précédentes.



WO 01/92322

PCT/FR01/01629

26

15. Biomatériau, par exemple sous la forme d'un tissu conjonctif reconstitué, ou de peau reconstituée, caractérisé en ce qu'il a été préparé à partir du collagène tel que défini à l'une quelconque des revendications précédentes, avantageusement ce biomatériau comprenant des cellules soit obtenues
- 5 sensiblement exclusivement à partir de sujets jeunes, soit obtenues sensiblement exclusivement à partir de sujets âgés, en particulier pour étudier le processus du vieillissement tissulaire et en particulier cutané et éventuellement tester l'efficacité d'ingrédients actifs sur ce processus.

WO 01/92322

PCT/FR01/01629

1/1

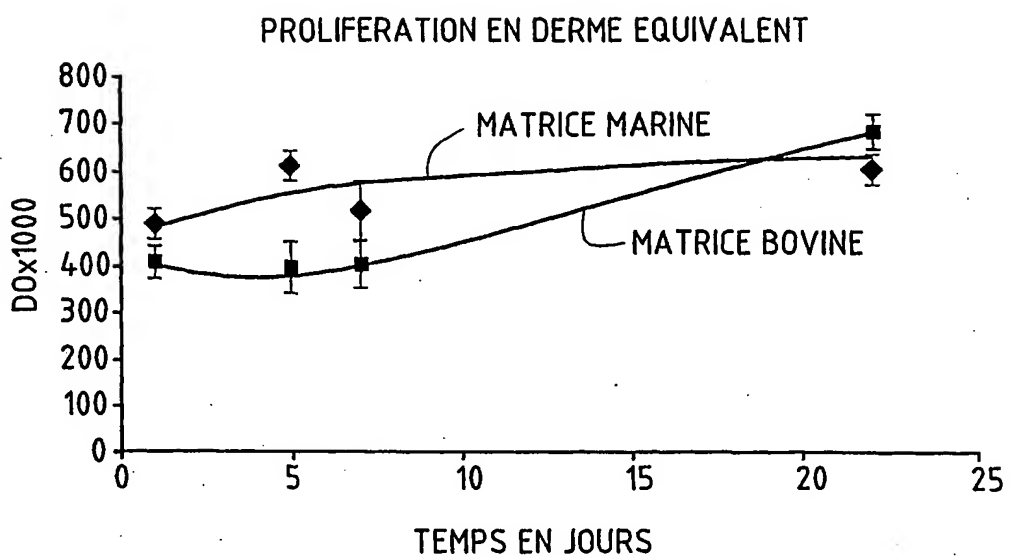


FIG.1

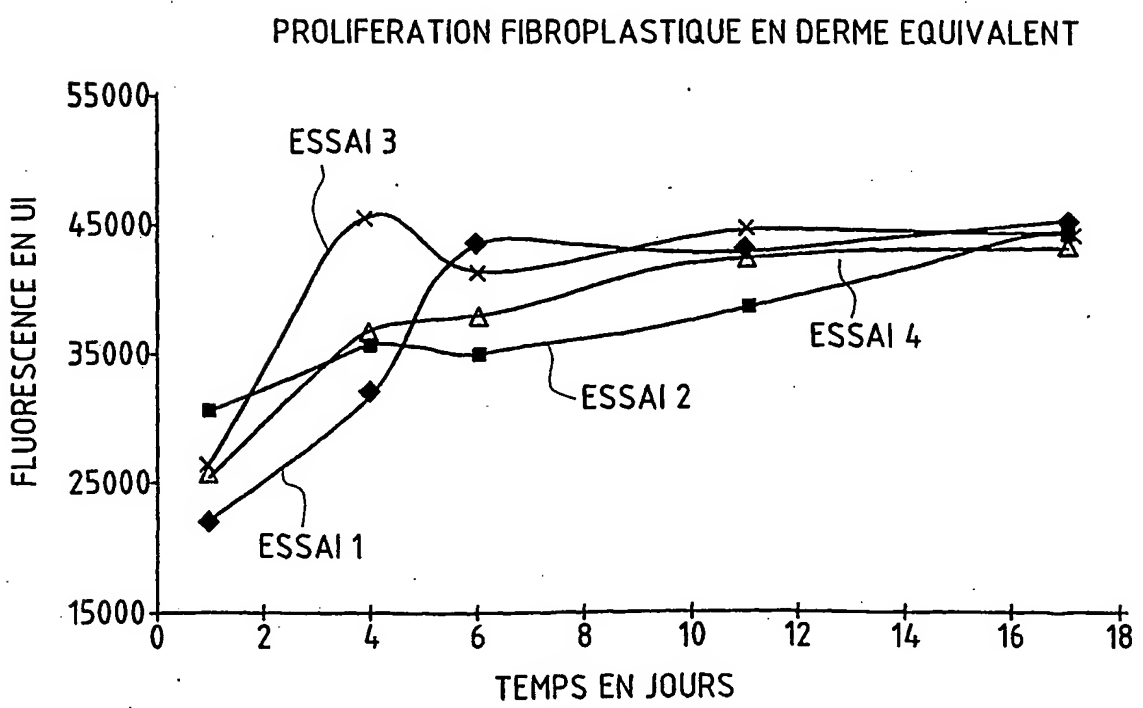


FIG.2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01629

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/46 C12N5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, SCISEARCH, EMBASE, BIOTECHNOLOGY ABS, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YEH M.I ET AL: "A novel native matrix for tissue engineering. Analysis of cell-matrix interaction." FASEB JOURNAL, vol. 14, no. 4, 15 March 2000 (2000-03-15), page A444 XP000982329 Annual Meeting of Professional Research Scientists: Experimental Biology 2000; San Diego, California, USA; April 15-18, 2000 ISSN: 0892-6638	1,2,14, 15
Y	abstract --- -/--	3-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 August 2001

Date of mailing of the international search report

23/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ALCONADA RODRIG., A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01629

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199520 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1995-151478 XP002161598 & JP 07 075566 A (MARINO FORUM 21 SH), 20 March 1995 (1995-03-20)	1,2,14, 15
Y	abstract	3-13
X	EP 0 753 313 A (HOKKAIDO GOVERNMENT ;DAIDO HOXAN INC (JP)) 15 January 1997 (1997-01-15)	1,2,14, 15
Y	page 4, line 45 -page 9, line 15	3-13
X	WO 97 20569 A (USALA ANTON LEWIS ;ENCELLE INC (US)) 12 June 1997 (1997-06-12)	1,3,4, 14,15
Y	* page 30, ligne 1-9 * * page 34, ligne 1-4 *	5-13
X	US 5 420 248 A (DEVICTOR PIERRE ET AL) 30 May 1995 (1995-05-30)	1,2,14, 15
Y	column 2, line 20-30 column 1, line 28-41	3-12
Y	WO 90 12055 A (BIOETICA SA) 18 October 1990 (1990-10-18) example 2	3,4,6
Y	US 5 166 187 A (COLLOMBEL CHRISTIAN ET AL) 24 November 1992 (1992-11-24) examples 1,5	7,9-11
Y	WANG MING-CHE ET AL: "Collagen fibres with improved strength for the repair of soft tissue injuries." BIOMATERIALS, vol. 15, no. 7, 1994, pages 507-512, XP000982411 ISSN: 0142-9612 the whole document	4,5
Y	FR 2 724 563 A (COLETICA) 22 March 1996 (1996-03-22) page 7, line 4-23; claim 8	8,12,13

-/-

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01629

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GIRAUD-GUILLE M -M M -M ET AL:                      "Structural aspects of fish skin collagen                      which forms ordered arrays via liquid                      crystalline states"                      BIOMATERIALS,GB,ELSEVIER SCIENCE                      PUBLISHERS BV., BARKING,                      vol. 21, no. 9, May 2000 (2000-05), pages                      899-906, XP004202455                      ISSN: 0142-9612                      the whole document</p>	1-15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/01629

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 7075566 A	20-03-1995	NONE	
EP 0753313 A	15-01-1997	JP 2731833 B	25-03-1998
		JP 9010246 A	14-01-1997
		CA 2179881 A	27-12-1996
		NO 962679 A	27-12-1996
		US 5698228 A	16-12-1997
WO 9720569 A	12-06-1997	US 5830492 A	03-11-1998
		AU 714465 B	06-01-2000
		AU 1119297 A	27-06-1997
		CA 2239498 A	12-06-1997
		EP 0865288 A	23-09-1998
		JP 2000507202 T	13-06-2000
		ZA 9610297 A	18-06-1997
US 5420248 A	30-05-1995	FR 2678624 A	08-01-1993
		AT 157386 T	15-09-1997
		CA 2112805 A	21-01-1993
		DE 69221872 D	02-10-1997
		EP 0592586 A	20-04-1994
		ES 2108759 T	01-01-1998
		WO 9301241 A	21-01-1993
		JP 2722014 B	04-03-1998
		JP 6511269 T	15-12-1994
WO 9012055 A	18-10-1990	FR 2645870 A	19-10-1990
		AT 140709 T	15-08-1996
		AU 5531690 A	05-11-1990
		BR 9007287 A	03-03-1992
		CA 2051426 A	13-10-1990
		DE 69027925 D	29-08-1996
		DE 69027925 T	19-12-1996
		EP 0466829 A	22-01-1992
		ES 2092507 T	01-12-1996
		HU 208840 B	28-01-1994
		JP 7103239 B	08-11-1995
		JP 4504586 T	13-08-1992
		KR 160309 B	15-01-1999
		MC 2187 A	16-09-1992
		NO 177502 B	19-06-1995
		RU 2061000 C	27-05-1996
		US 5264551 A	23-11-1993
US 5166187 A	24-11-1992	FR 2616318 A	16-12-1988
		AT 63825 T	15-06-1991
		DE 3863011 D	04-07-1991
		EP 0296078 A	21-12-1988
		WO 8810123 A	29-12-1988
		GR 3002084 T	30-12-1992
		JP 2500723 T	15-03-1990
FR 2724563 A	22-03-1996	FR 2724562 A	22-03-1996
		AU 3475395 A	29-03-1996
		EP 1019112 A	19-07-2000
		WO 9608277 A	21-03-1996

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 01/01629

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K14/46 C12N5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, SCISEARCH, EMBASE, BIOTECHNOLOGY ABS, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	YEH M.I ET AL: "A novel native matrix for tissue engineering. Analysis of cell-matrix interaction." FASEB JOURNAL, vol. 14, no. 4, 15 mars 2000 (2000-03-15), page A444 XP000982329 Annual Meeting of Professional Research Scientists: Experimental Biology 2000; San Diego, California, USA; April 15-18, 2000 ISSN: 0892-6638	1,2,14, 15
Y	abrégé --- -/--	3-13

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

\*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

\*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

\*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

\*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

\*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 août 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/08/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ALCONADA RODRIG..., A

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 01/01629

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199520 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1995-151478 XP002161598 & JP 07 075566 A (MARINO FORUM 21 SH), 20 mars 1995 (1995-03-20)	1,2,14, 15
Y	abrégé	3-13
X	EP 0 753 313 A (HOKKAIDO GOVERNMENT ;DAIDO HOXAN INC (JP)) 15 janvier 1997 (1997-01-15)	1,2,14, 15
Y	page 4, ligne 45 -page 9, ligne 15	3-13
X	WO 97 20569 A (USALA ANTON LEWIS ;ENCELLE INC (US)) 12 juin 1997 (1997-06-12)	1,3,4, 14,15
Y	* page 30, ligne 1-9 * * page 34, ligne 1-4 *	5-13
X	US 5 420 248 A (DEVICTOR PIERRE ET AL) 30 mai 1995 (1995-05-30)	1,2,14, 15
Y	colonne 2, ligne 20-30 colonne 1, ligne 28-41	3-12
Y	WO 90 12055 A (BIOETICA SA) 18 octobre 1990 (1990-10-18) exemple 2	3,4,6
Y	US 5 166 187 A (COLLOMBEL CHRISTIAN ET AL) 24 novembre 1992 (1992-11-24) exemples 1,5	7,9-11
Y	WANG MING-CHE ET AL: "Collagen fibres with improved strength for the repair of soft tissue injuries." BIOMATERIALS, vol. 15, no. 7, 1994, pages 507-512, XP000982411 ISSN: 0142-9612 le document en entier	4,5
Y	FR 2 724 563 A (COLETICA) 22 mars 1996 (1996-03-22) page 7, ligne 4-23; revendication 8	8,12,13

-/-



## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 01/01629

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>GIRAUD-GUILLE M -M M -M ET AL: "Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states" BIOMATERIALS,GB,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, vol. 21, no. 9, mai 2000 (2000-05), pages 899-906, XP004202455 ISSN: 0142-9612 le document en entier</p>	1-15

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 01/01629

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP 7075566 A	20-03-1995	AUCUN	
EP 0753313 A	15-01-1997	JP 2731833 B JP 9010246 A CA 2179881 A NO 962679 A US 5698228 A	25-03-1998 14-01-1997 27-12-1996 27-12-1996 16-12-1997
WO 9720569 A	12-06-1997	US 5830492 A AU 714465 B AU 1119297 A CA 2239498 A EP 0865288 A JP 2000507202 T ZA 9610297 A	03-11-1998 06-01-2000 27-06-1997 12-06-1997 23-09-1998 13-06-2000 18-06-1997
US 5420248 A	30-05-1995	FR 2678624 A AT 157386 T CA 2112805 A DE 69221872 D EP 0592586 A ES 2108759 T WO 9301241 A JP 2722014 B JP 6511269 T	08-01-1993 15-09-1997 21-01-1993 02-10-1997 20-04-1994 01-01-1998 21-01-1993 04-03-1998 15-12-1994
WO 9012055 A	18-10-1990	FR 2645870 A AT 140709 T AU 5531690 A BR 9007287 A CA 2051426 A DE 69027925 D DE 69027925 T EP 0466829 A ES 2092507 T HU 208840 B JP 7103239 B JP 4504586 T KR 160309 B MC 2187 A NO 177502 B RU 2061000 C US 5264551 A	19-10-1990 15-08-1996 05-11-1990 03-03-1992 13-10-1990 29-08-1996 19-12-1996 22-01-1992 01-12-1996 28-01-1994 08-11-1995 13-08-1992 15-01-1999 16-09-1992 19-06-1995 27-05-1996 23-11-1993
US 5166187 A	24-11-1992	FR 2616318 A AT 63825 T DE 3863011 D EP 0296078 A WO 8810123 A GR 3002084 T JP 2500723 T	16-12-1988 15-06-1991 04-07-1991 21-12-1988 29-12-1988 30-12-1992 15-03-1990
FR 2724563 A	22-03-1996	FR 2724562 A AU 3475395 A EP 1019112 A WO 9608277 A	22-03-1996 29-03-1996 19-07-2000 21-03-1996